

LEMBAR PENGESAHAN

AKTIVITAS ENZIM MERKURI REDUKTASE PADA *Azotobacter* SEBAGAI ENZIM PEREDUKSI Hg^{2+} MENJADI Hg^0

TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Sains
pada

Jurusan S-1 Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

ANJAR LULU SAKINAH
NRP. 1510 100 046

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

Dr. Enny Zulaika, M.P. (Pembimbing 1)

Surabaya, 23 Juli 2014

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si
NIP. 19690907 199803 2 001

AKTIVITAS ENZIM MERKURI REDUKTASE PADA
Azotobacter SEBAGAI ENZIM PEREDUKSI
 Hg^{2+} MENJADI Hg^0

Nama Mahasiswa : Anjar Lulu Sakinah
NRP : 1510 100 046
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. Enny Zulaika, M.P.

Abstrak

Merkuri adalah logam berat yang sangat toksik dan berbahaya. Beberapa bakteri dapat hidup di habitat yang tercemar merkuri disebut bakteri resisten merkuri, satu diantaranya adalah Azotobacter.

Tujuan penelitian adalah mendapatkan isolat unggul Azotobacter dari lahan Eco Urban Farming ITS yang resisten terhadap HgCl_2 dan mengetahui kemampuan aktivitas enzim merkuri reduktase sebagai bioreduktor Hg^{2+} menjadi Hg^0 . Isolasi dilakukan menggunakan media selektif Azotobacter agar. Pengujian resistensi merkuri dilakukan dengan metode goresan agar miring yang mengandung HgCl_2 . Aktivitas enzim merkuri reduktase dianalisis dengan metode MRA dan spektrofotometri pada panjang gelombang 340 nm.

Hasil isolasi mendapatkan 10 isolat Azotobacter resisten HgCl_2 , isolat A5 dan A9 mempunyai resistensi 10 mg/L HgCl_2 dengan pertumbuhan yang optimum dan mempunyai aktivitas merkuri reduktase relatif tinggi dengan daya reduksi ± 3 mg/L dan efisiensi reduksi $>70\%$ pada konsentrasi 5 mg/L HgCl_2 .

Kata kunci: Azotobacter, enzim merkuri reduktase, gen mer operon, Merkuri HgCl_2

MERCURY REDUCTASE ACTIVITY OF *Azotobacter*
ISOLATES AS A REDUCING AGENT
FOR MERCURIAL ION (Hg^{2+})

Student Name : Anjar Lulu Sakinah
NRP : 1510 100 046
Departement : Biology FMIPA ITS
Supervisor : Dr. Enny Zulaika, MP.

Abstract

Mercury is a heavy metal that its dangerous toxic. Some bacteria can living at contaminated mercury areas, called mercury resistant bacteria which one of them *Azotobacter*.

The purpose of this researched to get *Azotobacter* from Eco Urban Farming ITS land which resistant mercury HgCl_2 and determine activity of mercury reductase enzyme for reduction Hg^{2+} to Hg^0 . Methods isolation used selective *Azotobacter* agar, mercury resistant with added HgCl_2 different concentration, and activity of mercury reductase enzyme analyzed *MRA* method and spectrophotometry at 340 nm.

The result of isolation got 10 isolate *Azotobacter* what resistant mercury HgCl_2 , isolate A5 and A9 resistant 10 mg/L. with optimum growth and they have activity of mercury reductase enzyme more higher with reduction abilities ± 3 mg/L and efficiency reduction Hg^{2+} >70% in HgCl_2 5 mg/L concentration.

Keywords: *Azotobacter*, enzim merkuri reduktase, gen *mer operon*, Merkuri HgCl_2 .

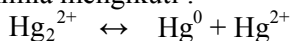
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Merkuri

Merkuri mempunyai nama *Hydragyrum* yang berarti perak cair, di alam lebih banyak ditemukan dalam mineral. Di antaranya yang dihasilkan dari bijih Sinabar (HgS). Bijih Sinabar mengandung unsur merkuri antara 0,1%-4%. Merkuri diproduksi dengan membakar merkuri sulfida (HgS) di udara (Polii & Sonya, 2002). Logam merkuri dilambangkan dengan merkuri, pada sistem periodik unsur kimia merkuri menempati urutan (NA) 80 dan mempunyai bobot atom (BA 200,59) serta memiliki densitas sebesar 13,55 gr/cm³ (Sudarmaji dkk., 2006). Secara umum merkuri berwujud cair pada suhu kamar (25°C) dengan titik beku paling rendah -39°C dan masih berwujud cair pada suhu 196°C, merupakan logam yang paling mudah menguap jika dibandingkan dengan logam-logam yang lain, dapat melarutkan bermacam-macam logam untuk membentuk “alloy” yang disebut dengan “amalgam” (Polii & Sonya, 2002).

Industri pengecoran logam dan semua industri yang menggunakan merkuri sebagai bahan baku maupun bahan penolong, limbahnya merupakan sumber pencemaran merkuri. Sebagai contoh antara lain adalah industri klor alkali, peralatan listrik, cat, termometer, tensimeter, industri pertanian, dan pabrik detonator. Kegiatan lain yang merupakan sumber pencemaran merkuri adalah praktek dokter gigi yang menggunakan amalgam sebagai bahan penambal gigi (Sudarmaji dkk., 2006).

Di alam, merkuri terbagi menjadi tiga bentuk yaitu Hg⁰ (metalik merkuri), Hg²⁺ (merkuri merkuri) dan Hg₂²⁺ (merkurous merkuri). ketiga bentuk merkuri tersebut menjaga keseimbangan struktur kimia mengikuti :



(Dash & Das, 2012).

Merkuri yang masuk ke tubuh manusia baik melalui rantai makanan maupun melalui pernapasan dapat menghambat

enzim Glutathione reductase dan *Seric phosproglucose isomerase* serum dengan mengikat gugus -SH (sulfhidril) dan apabila terakumulasi merusak otak, ginjal dan hati. Kerusakan jangka panjangnya dapat merusak system saraf pusat yang dapat memberikan efek yang sangat berbahaya, selain itu juga dapat mengakibatkan rusaknya kromosom yang menyebabkan cacat bawaan. (Polii & Sonya, 2002). Merkuri anorganik berbahaya untuk protein dan DNA yang dapat menyebabkan penyakit *fharing* dan hepatitis sedangkan toksisitas metilmerkuri dikenal sebagai penyakit Minamata, yang merusak sistem neurologi termasuk *encephalopathy* yang dapat menyebabkan kematian (Osborn *et al.*, 1997). Merkuri mempunyai toksisitas yang tinggi untuk semua organisme karena kekuatan afinitas terhadap grup thiol dalam protein (Takeuchi & Sugio, 2006). Metil merkuri berpotensi penyebab neurotoksin melalui proses bioakumulasi dan biomagnifikasi melalui rantai makanan (Martin *et al.*, 2008).

Ada dua proses alam yang memediasi siklus merkuri di lingkungan yaitu proses geologi dan biologi. Gas merkuri (Hg^0) dikeluarkan dari aktivitas alam dan antropogenik yang terdistribusi secara global keatmosfer dan terjadi foto-oksidasi mengakibatkan ion merkuri bercampur dengan ozon dan bergabung dengan air. Selanjutnya munculnya hujan mengendapkan merkuri anorganik pada permukaan bumi yang akan diserap oleh mikroorganisme pada ekosistem akuatik. Kemudian merkuri tersebut direduksi kembali membentuk gas dan akan terevapoasi ke udara yang akan memulai awal siklus kembali. Metil merkuri yang terbentuk akan terakumulasi oleh makhluk hidup akuatik melalui rantai makanan, dan selanjutnya akan dimakan oleh predator organisme diatasnya sehingga konsentrasi merkuri semakin tinggi (Dash & Das, 2012).

2.2 Bakteri Resisten Merkuri

Bakteri resisten merkuri adalah bakteri yang resisten merkuri dilingkungan habitatnya, baik yang bersifat bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Resistensi merkuri oleh bakteri

disebabkan adanya gen *mer operon* yang terdiri dari 2 tipe yaitu *mer* spektrum sempit yang hanya resisten merkuri anorganik dan *mer* spektrum luas yaitu resisten terhadap merkuri organik dan merkuri anorganik (Brown *et al.*, 2003). Gen *mer* operon terdapat di plasmid (Fox & Walsh, 1981) kromosom (Martin *et al.*, 2008) transposons, dan integron (Dash & Das, 2012; Martin *et al.*, 2008). Bakteri dikatakan resisten terhadap merkuri jika mampu tumbuh pada medium yang mengandung merkuri lebih dari 5 mg/L (De *et al.*, 2003).

Gen *mer* operon terdiri dari gen-gen struktural di antaranya gen merkuri reduktase (*merA*) dan gen transport protein yaitu *merT* dan *merP* yang bersebelahan oleh *merR* dan *merD* yang melibatkan regulasi ekspresi gen struktural dalam respon ion garam merkuri (Brown *et al.*, 2003). *Mer* operon terdiri dari gen regulator yaitu *merR* yang akan mentranskripsikan gen *mer* fungsional. *MerR* merupakan protein metalloregulator yang akan berikatan dengan wilayah promoter-operator baik secara regulasi positif dan regulasi negatif. *MerR* sebagai aktivasi transkripsi pada operon dengan adanya induksi Hg^{2+} dan akan menghambat transkripsi gen fungsional *mer* operon jika tidak ada Hg^{2+} . Pada distal gen promoter terdapat *merD* sebagai protein regulator sekunder yang berikatan lemah pada wilayah operator-promoter (Dash & Das, 2012). *MerA* mempunyai fungsi mereduksi ion merkuri yang toksik menjadi logam merkuri Hg^0 yang kurang toksik dan mudah menguap pada suhu kamar, sedangkan gen *merB* mempunyai fungsi mengkatalisis pemutusan ikatan merkurikarbon sehingga dihasilkan senyawa organik dan ion Hg^{2+} (Barkay *et al.*, 2003).

Dalam Osborn *et al.*, (1997) ada lima mekanisme resistensi dan detoksifikasi merkuri meliputi:

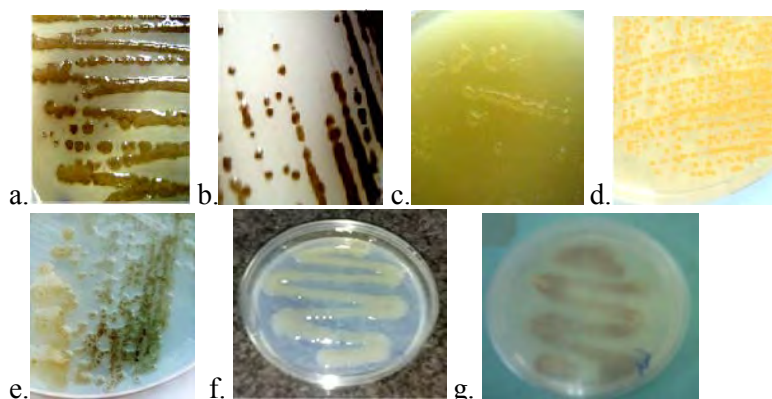
- a. Penurunan serapan ion merkuri. Hal ini terjadi pada strain *Enterobacter aerogenes* yang mengekspresikan protein dari dua plasmid dengan mengkode protein yang mampu mengurangi permeabilitas sel terhadap ion Hg^{2+} .

- b. Demetilasi metilmerkuri pada *Clostridium cochlearium* T-2P dua plasmidnya mengkode gen yang mampu merespon demetilasi organomerkuri yang akan bereaksi dengan hydrogen sulfida menjadi merkuri sulfida yang *insoluble*.
- c. Pengasingan metilmerkuri, pada *Desulfovibrio desulfuricans*, metilmerkuri dipertahankan pada level subtoksik dengan memproduksi hydrogen sulfide secara berkelanjutan kemudian bereaksi dengan metil merkuri menjadi dimetilmerkuri sulfide *insoluble*.
- d. Metilasi merkuri, beberapa bakteri mampu mengurangi toksistas metil merkuri dengan pengasingan atau volatilisasi dengan mekanisme mengikat Hg^{2+} pada ikatan gugus metil.
- e. Reduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 secara enzimatik yang melibatkan gen *merA* Hg^{2+} akan direduksi menjadi Hg^0 .

2.3. Genera *Azotobacter*

Azotobacter mempunyai sel bersifat ovoid, mempunyai diameter 1,5-2,0 μm dan bersifat pleomorfik berkisar rod sampai coccus. Tidak memproduksi endospora tetapi membentuk kista. Merupakan bakteri Gram negatif, motil dengan flagel peritrik, dan beberapa ada yang tidak motil. Bersifat aerob tetapi dapat tumbuh pada kondisi sedikit oksigen, bersifat kemoorganotrof menggunakan gula, alkohol dan garam sebagai sumber karbon. *Azotobacter* mampu memfiksasi nitrogen dan secara umum bersifat nonsimbiotik. Membutuhkan molibdenum untuk fiksasi nitrogen, tetapi beberapa dapat diganti vanadium. Bersifat nonproteolitik, dan menggunakan nitrat, garam ammonium dan asam amino sebagai sumber nitrogen. *Azotobacter* bersifat katalase positif, dengan range pH yang mampu tumbuh 4,8-8,5 dan optimum pada pH 7-7,5 (Holt *et al.*, 1994). Banyak ditemukan di tanah dan beberapa di air. ciri koloni pada kebanyakan spesies smooth, opaque, convex rendah. *Azotobacter* tumbuh membentuk kista mampu mensintesis alginat, serta

memproduksi siderophore untuk merespon saat zat besi terbatas (Brenner *et al.*, 1957). *Azotobacter* termasuk bakteri fiksasi nitrogen yang hidup bebas, masuk dalam gamma proteobacteria, ukuran sel seperti yeast, isolat mampu membentuk lapisan lendir, dan dapat membentuk struktur istirahat yang disebut kista seperti endospora, kista *Azotobacter* tidak khusus resisten terhadap panas, dan bukan bentuk dorman, Kista *Azotobacter* menunjukkan resisten terhadap desikasi, ultraviolet, desinterasi mekanik dan radiasi. (Madigan *et al.*, 2006). Beberapa karakter koloni *Azotobacter* dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Beberapa karakteristik koloni pada spesies *Azotobacter*. (a. *Azotobacter nigricans* b. *Azotobacter chroococcum* c. *Azotobacter vinelandii* (Jimenes *et al.*, 2011). d. *Azotobacter paspali* e. *Azotobacter armeniacus* (Aquilanti *et al.*, 2004). f. *Azotobacter chroococcum* kultur muda g. *Azotobacter chroococcum* kultur tua). (Salhia, 2010).

Pada penelitian Zulaika dkk. (2011), *Azotobacter* yang diisolasi dari sungai Kalimas Surabaya dapat hidup pada media yang mengandung 25 mg/L HgCl_2 . Pada penelitian Ghosh *et al.*, (1999) *Azotobacter chroococcum* yang diisolasi dari tanah, sebagai bakteri fiksasi nitrogen yang resisten terhadap merkuri. Aktivitas enzim merkuri reduktase optimum pada 20 μM HgCl_2 dari seluruh perlakuan. Penelitian Ray *et al.*, (1989) ditemukan *Azotobacter* yang mampu memvolatilisasi merkuri mencapai

lebih dari 75%, *Beijerinckia* sebesar lebih dari 80%, dan *Azomonas* lebih dari 10%.

Mekanisme resistensi merkuri dikontrol oleh gen *mer* operon terdiri dari gen operator, promotor, dan regulator. Operon akan berfungsi ketika gen seperti *merP*, *merT*, *merD*, *merA*, *merF*, *merC*, dan *merB* diekspresikan sehingga menunjukkan mekanisme resistensi merkuri (Dash & Das, 2012). Bakteri Gram negatif menunjukkan toleransi lebih besar terhadap ion logam yang lebih besar dibandingkan Gram positif karena bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks sehingga mampu mengikat dan mengimobilisasi ion logam (Ahmad *et al.*, 2005), termasuk logam merkuri. Berdasarkan Ahmad *et al.*, (2005) mengemukakan bahwa kemampuan bakteri menghasilkan polisakarida ekstraseluler dapat melindungi sel dari pengaruh toksik logam berat, hasil penelitiannya memberikan indikasi bahwa bakteri heterotrof yang ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung merkuri konsentrasi 150-200 µg/g akan mengalami penurunan viabilitas setelah 21 hari inkubasi. Grup bakteri heterotrof tidak dapat hidup pada inkubasi 28 hari dengan kandungan logam berat 100 µg/g, dan tingginya logam berat akan menurunkan keanekaragaman bakteri penambat nitrogen.

2.4 Enzim Merkuri reduktase

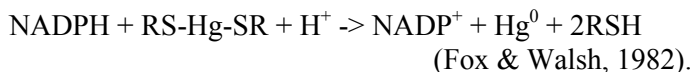
Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel yang mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul nutrisi dan membuat makromolekul sel dari prekursor sederhana (Lehninger, 2004). Klasifikasi Enzim berdasarkan reaksi katalisisnya dibedakan menjadi 6 kelompok Tabel (2.1). Merkuri reduktase adalah flavoprotein yang merupakan enzim oksidoreduktase sebagai kunci detoksifikasi merkuri pada bakteri. Enzim ini mengkatalisis reaksi reduksi ion merkuri anorganik menjadi elemental merkuri yang volatil, selanjutnya secara non enzimatis dikeluarkan dari sel (Fox & Walsh, 1982).

Tabel 2.1. Klasifikasi enzim berdasarkan reaksi katalisis

No	Katalisis	Jenis reaksi yang dikatalisis
1	Oksidoreduktase	Pemindahan elektron
2	Transferase	Reaksi pemindahan gugus fungsional
3	Hidrolase	Reaksi hidrolisis (Pemindahan gugus fungsional ke air)
4	Liase	Penambahan gugus ke ikatan ganda atau sebaliknya
5	Isomerase	Pemindahan gugus didalam molekul, menghasilkan bentuk isomer
6	Ligase	Pembentukan ikatan C-C, C-S, C-O dan C-N oleh reaksi kondensasi yang berkaitan dengan penguraian ATP

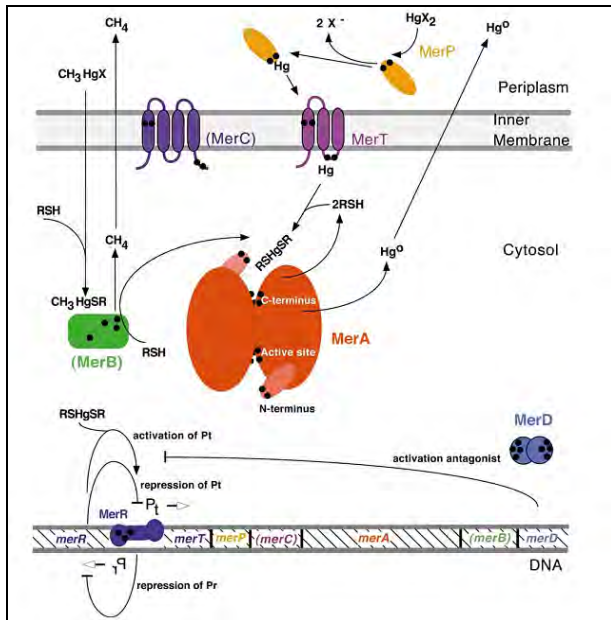
(Lehninger, 2004).

Flavin adenine dinucleotide (FAD) menggunakan *Nikotinamida adenine dinukleotida* (NADPH) sebagai donor elektron. Adanya gugus thiol akan berikatan dengan Hg^{2+} membentuk dimercaptida, RS-Hg-SR dengan reaksinya sebagai berikut:



Mekanisme reduksi enzimatik terjadi melalui beberapa tahapan. Prosesnya diawali dengan masuknya ion Hg^{2+} ke dalam sel. *MerP* merupakan protein periplasma yang berfungsi untuk menyimpan sementara Hg^{2+} di periplasma kemudian melewati ion Hg^{2+} ke transporter inner membran yaitu *merT*. Dari *merT*, ion Hg^{2+} akan menuju molekul merkuri reduktase dimana sisi pengikatan substratnya terdapat pada bagian C-terminus. Hg^{2+} akan direduksi menjadi Hg^0 dengan adanya transfer elektron dengan NADPH sebagai donor elektron dan Hg^{2+} sebagai akseptor elektron (Brown *et al.*, 2003), secara enzimatik volatilisasi Hg^{2+} menjadi Hg^0 ditunjukkan pada Gambar 2.2.

Purifikasi *merA* sudah terjadi awal tahun 1970 dari *Pseudomonas* K62 dan *E.coli* dilakukan oleh Barkay *et al.*, (2003). Beberapa penelitian ekstraksi gen *merA* yang menyandi enzim merkuri reduktase dari bakteri diantaranya *Citrobacter freundii* mempunyai nukleotida panjang 1141 bp (Martins *et al.*, 2008). Penelitian Ghosh *et al.*, 1999 telah memurnikan enzim merkuri reduktase dari *Azotobacter chroococcum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Takeuchi & Sugio, 2006). *Pseudomonas aeruginosa* PA09501 pada bagian plasmid pVS1 (Fox & Walsh, 1982), dan *Citrobacter freundii* (Martin *et al.*, 2008).



Gambar 2.2. Mekanisme reduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 pada bakteri Gram negatif (Barkay *et al.*, 2003).

BAB III METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA ITS. Penelitian dilaksanakan dari Bulan Januari – Maret 2014. Sonikasi sel dilakukan di *Tropical Disease Diagnostic Center (TDDC) Institute of Tropical Disease (ITD)* Universitas Airlangga.

3.2 Alat, Bahan dan Cara Kerja

3.2.1 Isolasi *Azotobacter*

Sampel tanah diambil dari lahan *Eco Urban Farming* ITS secara komposit kemudian dilakukan isolasi bakteri 10 gram tanah dimasukkan kedalam 90 ml akuades steril, selanjutnya dibuat seri pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-8} (Saraswati dkk., 2007). Larutan diambil 1 ml dari pengenceran ditumbuhkan pada media selektif *Azotobacter* agar (*High selective media* M372-500G) dengan 0,1 mg/L HgCl_2 dengan metode spread dan diinkubasi pada suhu ruang. Koloni *Azotobacter chroococcum* tampak setelah 24 jam inkubasi dengan ciri putih basah dan berubah menjadi coklat gelap setelah 3-5 hari. Ciri koloni *Azotobacter vinelandii* dan *Azomonas* sama, hanya tidak berubah gelap. Sedangkan koloni *Azotobacter paspali*, setelah inkubasi 48 jam, pusat koloni menjadi kuning. (Saraswati dkk., 2007).

Koloni yang tumbuh diamati karakteristik koloninya dibandingkan dengan kontrol positif yaitu *Azotobacter chroococcum* (Fakultas Pertanian, UGM Yogyakarta). Koloni yang diduga *Azotobacter* dimurnikan dengan metode 16 gores pada media *Nurient Agar* dan dilakukan pewarnaan *methylen blue* untuk pengamatan kemurnian *Azotobacter*. Dilakukan pewarnaan Gram dan pewarnaan kista untuk memastikan bahwa isolat tersebut adalah *Azotobacter*.

3.2.2 Uji resistensi HgCl₂

Uji resistensi dilakukan dengan menumbuhkan isolat *Azotobacter* pada media *Azotobacter* agar dan ditambahkan HgCl₂ sesuai konsentrasi uji yaitu 0,5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L dan seterusnya sampai konsentrasi yang mampu ditoleransi *Azotobacter* dengan interval selanjutnya 5 mg/L. Diinkubasi 24 jam pada suhu ruang dan diamati pertumbuhan koloninya sehingga didapatkan isolat *Azotobacter* yang tumbuh merupakan isolat resisten terhadap merkuri HgCl₂.

3.2.3 Pembuatan kurva pertumbuhan genera *Azotobacter*

Satu ose koloni *Azotobacter* diinokulasikan ke dalam 40 ml media NB, dengan konsentrasi bahan $\frac{1}{2}$ dari awalnya. Dihomogenkan dengan *rotary shaker* (100 rpm) dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 24 jam (sebagai stok kultur). Selanjutnya 40 ml stok kultur dimasukkan kedalam 160 ml media NB- HgCl₂ 0,1 mg/L dan diinkubasi diatas *rotary shaker* (100 rpm). Setiap selang 1 jam, diambil 2 ml dimasukkan kedalam kuvet diukur nilai kerapatan optik (*OD*; *Optical Density*) pada panjang gelombang (λ) 600 nm. Pengukuran OD dimulai dari jam ke-0 sampai jam ke-24. Dibuat kurva pertumbuhan dengan sumbu x sebagai waktu (t) dan sumbu y sebagai nilai OD. Dari kurva pertumbuhan akan didapat fase eksponensial sehingga akan didapatkan waktu inkubasi (μ jam) sebagai waktu awal perlakuan.

3.2.4 Persiapan ekstrak enzim

Satu ose koloni *Azotobacter* diinokulasikan kedalam 10 ml media NB dihomogenkan dengan *rotary shaker* (100 rpm) diinkubasi dalam suhu ruang selama waktu eksponen, selanjutnya diambil 3 ml kultur sel dan diinokulasikan ke 30 ml NB-HgCl₂ 0,1 mg/L dan inkubasi lalu dipanen pada (μ jam) sesuai kurva pertumbuhan. Dilakukan perhitungan jumlah sel/ml dengan *Haemocytometer Improved Nauber*, kultur sel disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C, supernatan dibuang, pelet sel disuspensikan dengan 30 ml PBS

(*Phospat Buffer Saline*) $\text{pH} \pm 7$. Suspensi sel disonikasi dengan *ultrasonic processor* (600 watt, amplitude 50%) selama 60 detik dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C (Ghosh *et al.*, 1999; Sulastri, 2002) Supernatant sebagai ekstrak enzim dipindah secara hati-hati kedalam botol gelap yang bersih dan steril kemudian disimpan pada suhu -20°C (Ogunseitan, 1998).

3.2.5 Uji aktivitas enzim merkuri reduktase

Metode pengukuran aktivitas enzim merkuri reduktase dilakukan dengan menambahkan ekstrak enzim kedalam larutan MRA (*Mercury Reduktase Assay*) dengan perbandingan 1:1. Larutan MRA terdiri dari 50 mM larutan PBS $\text{pH} \pm 7$; 0,5 mM EDTA; 0.1% (vol/vol) β -mercaptoethanol, 100 μM NADH, 0,2 mM, MgSO_4 dan HgCl_2 (Meissner & Falkinham III, 1984; Ogunseitan, 1998), HgCl_2 yang ditambahkan sesuai dengan perlakuan yang diuji yaitu 5 mg/L, 10 mg/L dan 15 mg/L. Inkubasi dilakukan selama 0, 30, 60, dan 120 menit pada suhu ruang. Pengukuran aktivitas enzim merkuri reduktase menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang λ 340 nm (Zeroual *et al.*, 2003). Sebagai kontrol adalah larutan MRA tanpa penambahan ekstrak enzim yang diinkubasi 0 menit. Satu unit aktivitas enzim merkuri reduktase didefinisikan sebagai jumlah μM NADH yang teroksidasi per jumlah sel permenit dengan satuan μM NADH/jumlah sel/menit (Zeroual *et al.*, 2003). Seluruh pengukuran aktivitas enzim merkuri reduktase dilakukan pengulangan tiga kali.

3.2.6 Pembuatan kurva standard NADH

Konsentrasi NADH yang digunakan adalah 100 μM sehingga konsentrasi yang dibuat untuk kurva standard NADH adalah 0 μM , 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM , 60 μM , 70 μM , 80 μM , 90 μM , dan 100 μM . Larutan NADH berbagai konsentrasi tersebut diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang λ 340 nm.

Perhitungan HgCl_2 tereduksi (mg/L)

$$= (N \mu\text{M}/1.000.000) \times 271,59 \times 1000 \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan :

N = NADH teroksidasi
 1.000.000 = konversi M menjadi μM
 271,59 = massa relatif HgCl_2
 1000 = konversi gram menjadi mg

Perhitungan Hg^{2+} tereduksi (mg/L)

$$= (\text{Ar Hg}/\text{Mr HgCl}_2) \times \text{mg/L HgCl}_2 \text{ tereduksi} \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan:

Ar = massa atom relatif Hg (= 200,59)

Mr = massa molekul relatif HgCl_2 (= 271,59) (Zulaika, 2013).

3.3 Rancangan Penelitian

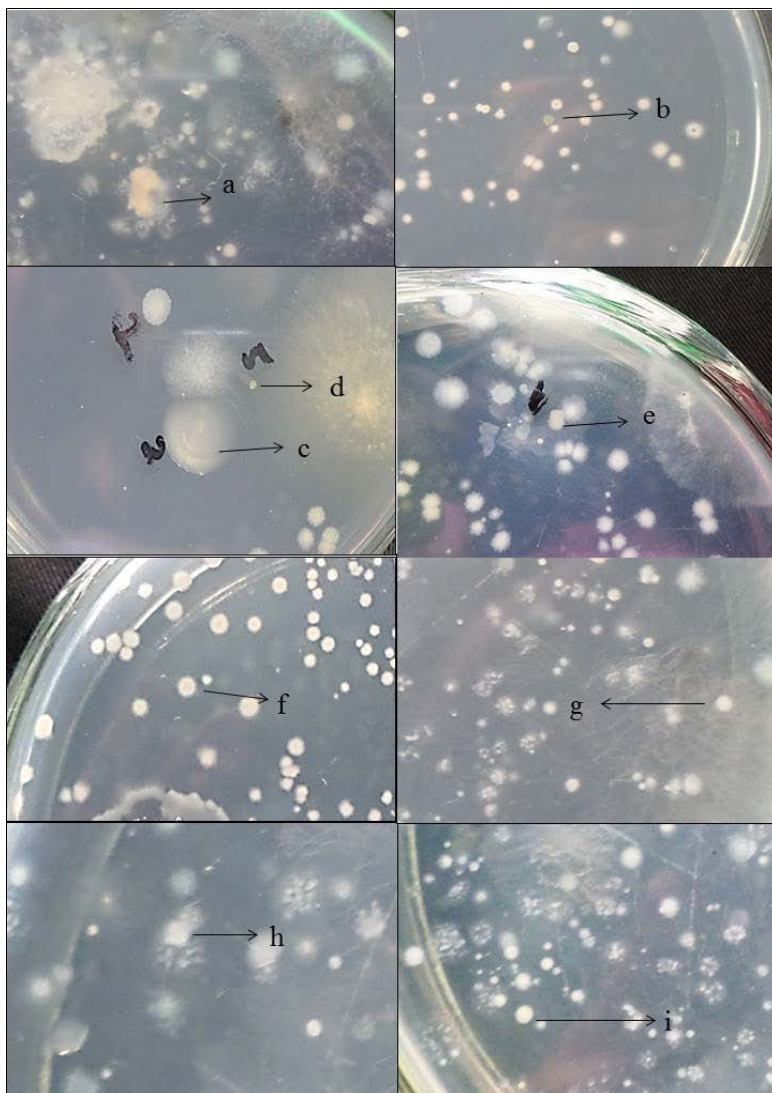
Penelitian dilakukan pada skala laboratorium secara deskriptif kuantitatif dengan waktu inkubasi 0, 30, 60 dan 120. Selanjutnya dilakukan analisis secara kuantitatif berdasarkan hasil aktivitas enzim merkuri reduktase (unit) dan μM NADH teroksidasi serta konsentrasi Hg^{2+} yang tereduksi.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi *Azotobacter*

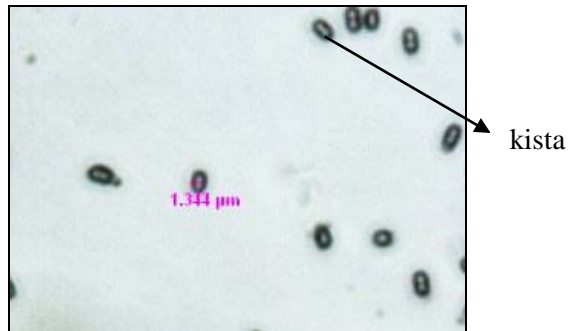
Isolasi *Azotobacter* diawali dengan pengenceran bertingkat hingga 10^{-7} dengan akuades steril. Hal ini dilakukan supaya didapatkan koloni yang memenuhi standard penghitungan jumlah koloni yaitu 30-300 sehingga memudahkan untuk identifikasi. Koloni yang tumbuh pada media agar *Azotobacter* diasumsikan adalah genus *Azotobacter*, koloni yang digunakan sebagai isolat uji adalah koloni yang berwarna krem sampai coklat setelah 3-5 hari inkubasi yang diasumsikan *Azotobacter chroococcum* (Gambar 4.1), Kontrol positif yang digunakan adalah *A. chroococcum* dari fakultas pertanian Universitas Gajah Mada (UGM).

Koloni yang berwarna krem sampai coklat adalah isolat yang diidentifikasi sebagai *A. chroococcum*. Perubahan warna koloni disebabkan adanya mekanisme pengikatan nitrogen bebas oleh isolat *A. chroococcum* dengan indikator bromtimol biru sehingga media akan berubah menjadi biru. Isolat *A. chroococcum* akan melakukan metabolisme dengan memanfaatkan mannitol sebagai sumber karbon (C) dan mengubah pH media menjadi asam (pH rendah) ditandai dengan perubahan warna biru menjadi krem-coklat (Muhaimin *dkk.*, 2013). Selain itu pada media agar *Azotobacter* ditambahkan molibdenum (Na_2MoO_4) sebagai kofaktor yang sangat esensial yang diperlukan untuk metabolisme N bakteri (Armiadi, 2009). Molibdenum adalah logam yang dibutuhkan untuk *Azotobacter* (Holt *et al.*, 1994). Hasil isolasi *Azotobacter* didapatkan 10 isolat yang diberi kode A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10.



Gambar 4.1 Isolat uji yang diidentifikasi sebagai *Azotobacter chroococcum*..(a) Isolat A1a. (b) Isolat A2. (c) Isolat A3. (d) Isolat A5 (e) Isolat A6. (f) Isolat A7. (g) Isolat A8. (h) Isolat A9. (i) Isolat A10.

[illegible]



Gambar 4.2. Kista yang terbentuk pada isolat *Azotobacter* dengan pewarnaan Giemsa.

4.2 Uji Resistensi HgCl_2

Pengujian resistensi 10 isolat *Azotobacter* terhadap HgCl_2 dimulai dengan konsentrasi terendah sebesar 0,5 mg/L, kemudian dilanjutkan dengan konsentrasi 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 15 mg/L, dan 20 mg/L. Isolat yang tumbuh pada media yang mengandung HgCl_2 merupakan *Azotobacter* yang resisten terhadap merkuri. Hasil uji resistensi ditampilkan pada Tabel 4.2. Pada konsentrasi 5 mg/L kesepuluh isolat mampu tumbuh dengan baik, hal ini menunjukkan 10 sudah termasuk bakteri resisten merkuri (BRM). Bakteri dikatakan resisten terhadap merkuri jika mampu tumbuh pada medium yang mengandung merkuri lebih dari 5 mg/L (De *et al.*, 2003).

Pada konsentrasi HgCl_2 10 mg/L hanya 6 isolat ditambah isolat kontrol *A. chroococcum* yang mampu tumbuh yaitu A1a dengan pertumbuhan 50%, isolat *Azotobacter* A5, A6 dengan pertumbuhan 100%, isolat *Azotobacter* A7, A9, dan A10 tumbuh dengan 100% serta *A. chroococcum* mencapai 50%. Selanjutnya yang digunakan sebagai isolat untuk uji aktivitas enzim merkuri reduktase adalah isolat yang 100% resisten pada konsentrasi HgCl_2 20 mg/L dengan karakter koloni yang berbeda diantaranya adalah isolat *Azotobacter* A5 dan A9, kemudian ditambah isolat *Azotobacter* A1 sebagai pembanding, sebab karakter koloni

Tabel 4.2 Persentase (%) tumbuh hasil uji resistensi HgCl₂

Kode Isolat	Konsentrasi HgCl ₂ (mg/L)				
	0.5	5	10	15	20
A1a	100	60	50	-	-
A1b	100	100	-	-	-
A2	100	100	-	-	-
A3	100	80	-	-	-
A5	100	90	100	50	50
A6	100	100	100	50	25
A7	100	90	100	50	-
A8	100	80	-	-	-
A9	100	100	80	35	30
A10	100	100	80	60	-
<i>Azotobacter chroococcum</i>	100	100	50	50	-

*inkubasi dilakukan 48 jam

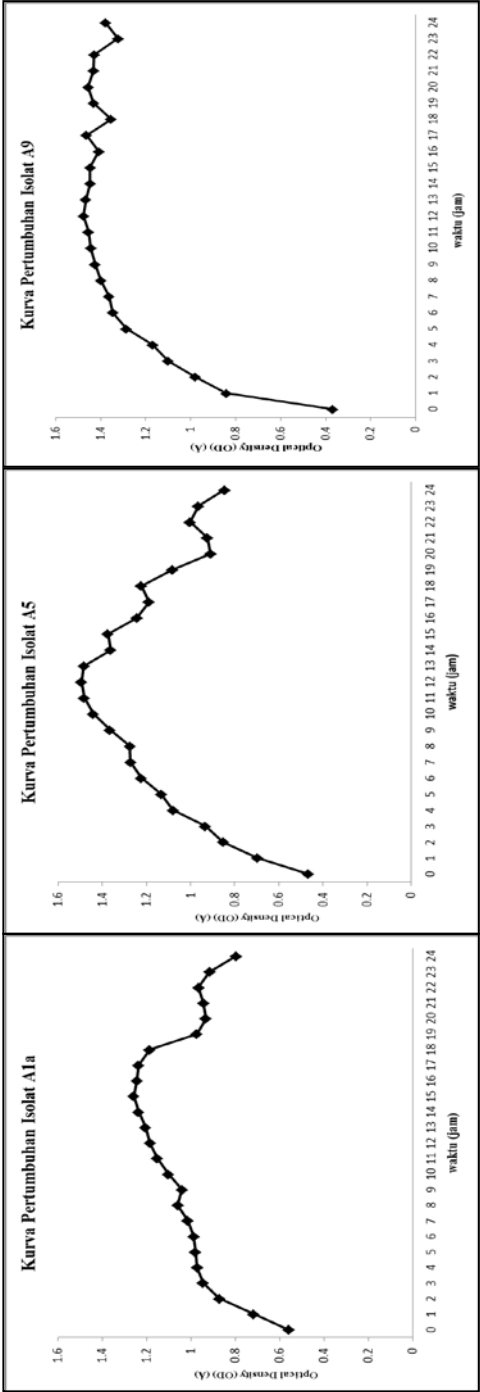
Azotobacter A1 yang mendekati kontrol *A. chroococcum* dan isolat kontrol *A. chroococcum*.

Bakteri resisten merkuri toleransi terhadap logam berat karena mempunyai gen yang mengontrol mekanisme resisten terhadap merkuri didalam kromosom, plasmid, atau transposon (Zulaika, *et al.*, 2012). Secara umum ada dua kemampuan resistensi bakteri yaitu dengan mekanisme enzimatik dan mekanisme biosorpsi (Rehman *et al.*, 2007).

4.3 Kurva Pertumbuhan Genera *Azotobacter*

Kurva pertumbuhan digunakan untuk menentukan umur perlakuan dengan menghitung rata-rata waktu pada fase awal eksponensial dan fase akhir eksponensial. Pada isolat kontrol tidak dilakukan pengamatan kurva pertumbuhan, hasil kurva pertumbuhan dilakukan pada 3 isolat *Azotobacter* uji ditampilkan pada Gambar 4.3.

Pola pertumbuhan isolat *Azotobacter* A1a, A5 dan A9 mempunyai pola pertumbuhan yang hampir sama (Gambar 4.3). Fase lag merupakan fase adaptasi, pada kurva pertumbuhan tidak



Gambar 4.3 Kurva pertumbuhan *Azotobacter* A1a, A5 dan A9

dijumpai sebab hasil pengukuran OD (*Optical Density*) dilakukan setelah melakukan subkultur pada media yang sama. Apabila subkultur dilakukan dalam keadaan fase eksponensial pada medium yang sama maka tidak akan terjadi fase lag dan secara cepat akan memasuki kedalam fase eksponensial (Madigan *et al.*, 2006). Pada penelitian ini pemindahan inokulum *Azotobacter* dilakukan setelah 24 jam, pada medium yang sama sehingga langsung terjadi fase eksponensial dan tidak tampak adanya fase adaptasi. Fase eksponensial pada isolat *Azotobacter* A5 dan A9 mempunyai pola hampir sama yaitu terjadi pada jam ke-1 sampai jam ke-13 berbeda dengan isolat *Azotobacter* A1a mempunyai fase eksponensial yang terjadi pada jam ke-1 sampai jam ke-17. Pertumbuhan sel pada fase eksponensial biasanya paling tinggi dibandingkan fase-fase yang lain pada pola pertumbuhan (Madigan *et al.*, 2006). Selama pertumbuhan sel terjadi peningkatan massa sitoplasma pada saat fase eksponensial akibatnya massa sel akan meningkat pula (Cooper, 2003).

Fase Stasioner merupakan fase dimana tidak terjadi peningkatan jumlah sel sehingga dapat dikatakan rasio pertumbuhan populasinya sama dengan 0 (Madigan *et al.*, 2006). Fase stasioner dianggap sebagai fase stagnan dan ketika nutrisi pada media mulai habis maka terjadi cekaman dan sel akan mengeluarkan hasil metabolisme untuk bertahan, tetapi tidak akan lama sehingga pada akhirnya akan mati, kondisi demikian akan dimulai masuknya fase kematian (Llorens *et al.*, 2010).

Berdasarkan fase pertumbuhan, umur perlakuan untuk pengujian aktivitas enzim merkuri reduktase saat dilakukan proses ekstraksi enzim yaitu isolat *Azotobacter* A1a pada jam ke-9 isolat *Azotobacter* A5 dan A9 dilakukan pada jam ke-7. Kurva pertumbuhan ditampilkan pada Gambar 4.3.

4.4 Aktivitas Enzim Merkuri Reduktase dan NADH Teroksidasi

Pengukuran aktivitas enzim merkuri reduktase menggunakan metode MRA (*mercury reductase assays*) dengan konsentrasi HgCl_2 5 mg/L, 10 mg/L dan 15 mg/L. Satu unit aktivitas enzim merkuri reduktase didefinisikan sebagai jumlah NADH yang teroksidasi per jumlah sel per menit (μM NADH/jumlah sel/menit) (Zeroual *et al.*, 2003). Aktivitas enzim merkuri reduktase ditunjukkan pada Tabel 4.3. Aktivitas enzim merkuri reduktase tergantung adanya NADPH ataupun NADH sebagai bagian yang essensial untuk donor elektron (Meissner and Falkinham III, 1984).

Tabel 4.3 Aktivitas enzim merkuri reduktase

Isolat	Waktu (menit)	Aktivitas Mer-red (unit/ 10^9 sel/menit) pada Kons. HgCl_2 5 mg/L	Aktivitas Mer-red (unit/ 10^9 sel/menit) pada Kons. HgCl_2 10 mg/L	Aktivitas Mer-red (unit/ 10^9 sel/menit) pada Kons. HgCl_2 15 mg/L
A1a	30	0.00121 \pm 0,001	0.00109 \pm 0,001	0.00114 \pm 0,000
	60	0.00060 \pm 0,001	0.00055 \pm 0,001	0.00056 \pm 0,000
	120	0.00030 \pm 0,003	0.00028 \pm 0,000	0.00030 \pm 0,001
A5	30	0.00255 \pm 0,001	0.00271 \pm 0,005	0.00293 \pm 0,002
	60	0.00117 \pm 0,006	0.00014 \pm 0,004	0.00149 \pm 0,001
	120	0.00060 \pm 0,003	0.00072 \pm 0,001	0.00075 \pm 0,001
A9	30	0.00254 \pm 0,012	0.00260 \pm 0,005	0.00285 \pm 0,002
	60	0.00115 \pm 0,005	0.00123 \pm 0,006	0.00138 \pm 0,007
	120	0.00062 \pm 0,006	0.00072 \pm 0,003	0.00073 \pm 0,003
<i>Azotobacter chroococcum</i>	30	0.00222 \pm 0,001	0.00179 \pm 0,007	0.00183 \pm 0,001
	60	0.00123 \pm 0,001	0.00110 \pm 0,003	0.00107 \pm 0,002
	120	0.00063 \pm 0,001	0.00056 \pm 0,000	0.00053 \pm 0,005

Berdasarkan Tabel 4.3. Waktu inkubasi yang berbeda, menunjukkan aktivitas enzim merkuri reduktase yang berbeda.

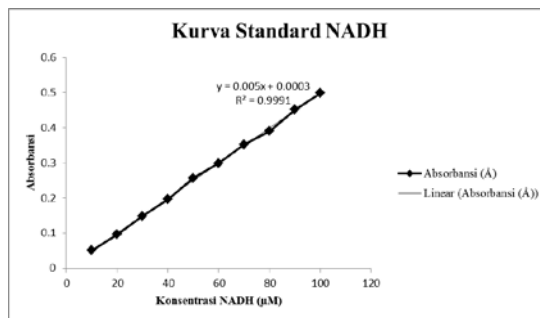
Semakin lama waktu inkubasi maka semakin rendah aktivitas enzim merkuri reduktase. Enzim merkuri reduktase memerlukan koenzim NADPH untuk mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 . Beberapa strain bakteri dapat menggunakan NADH sebagai koenzim (Gadd, 1990; Sulastri, 2002).

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh adanya substrat (Lehninger, 2004). Substrat yang digunakan untuk mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 adalah NADH. Aktivitas enzim merkuri reduktase semakin lama semakin berkurang dengan waktu inkubasi yang semakin lama. Hal ini dikarenakan substrat semakin berkurang, substrat pada penelitian ini hanya diberikan satu kali dengan konsentrasi 100 μM sehingga NADH semakin habis dalam pengikatan enzim dan substrat. Hal ini tampak dari keseluruhan isolat A1a, A5, A9 dan isolat kontrol *A. chroococcum*. Dari ketiga waktu inkubasi aktivitas enzim merkuri reduktase paling efektif pada waktu inkubasi 30 menit, pada keseluruhan konsentrasi HgCl_2 yang diberikan.

Aktivitas enzim merkuri reduktase membutuhkan donor elektron NADH untuk mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 . Konsentrasi NADH yang digunakan adalah 100 μM . Untuk menghitung NADH teroksidasi digunakan kurva standard NADH supaya Hg^{2+} tereduksi dapat dihitung. Kurva standard NADH menggunakan konsentrasi NADH secara bertingkat dari 0 μM sampai dengan 100 μM dengan interval 10 μM (Tabel 4.4). Berdasarkan nilai absorbansi NADH untuk kurva standard yaitu 10 μM sampai dengan 100 μM dibuat kurva standard NADH ditampilkan pada Gambar 4.4.

Tabel 4.4 Absorbansi NADH untuk kurva standard

Konsentrasi NADH (μM)	Absorbansi (\AA)
10	0.052
20	0.097
30	0.149
40	0.197
50	0.258
60	0.299
70	0.353
80	0.391
90	0.452
100	0.499



Gambar 4.4 Kurva standard NADH.

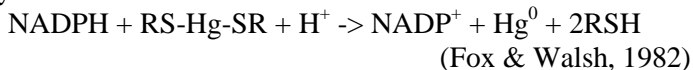
Berdasarkan Gambar 4.4 kurva standard NADH mempunyai persamaan linier $Y = 0,005x + 0,0003$. Selanjutnya persamaan ini digunakan untuk perhitungan NADH teroksidasi. NADH berfungsi sebagai substrat dan koenzim dalam reaksi oksidasi reduksi (pemindahan gugus H atau elektron). Pada reduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 gugus yang berperan sebagai koenzim adalah nikotinamid yang dalam bentuk tereduksi dapat menyerap panjang gelombang 340 nm (Murray, 1996). Hasil NADH teroksidasi digunakan untuk menghitung Hg^{2+} tereduksi dan efisiensi reduksi Hg^{2+} (Tabel 4.5).

Tabel 4.5 NADH teroksidasi

Kode Isolat/ waktu inkubasi	Konsentrasi HgCl ₂ (mg/L)	NADH teroksidasi (μM)		
		30 (menit)	60 (menit)	120 (menit)
A1a	5	7.25	7.22	7.30
	10	6.50	6.59	6.75
	15	6.81	6.74	7.14
A5	5	18.11	18.41	18.69
	10	16.22	16.75	17.26
	15	17.54	17.90	17.99
A9	5	15.20	13.77	14.86
	10	15.55	14.74	17.19
	15	17.07	16.58	17.42
<i>Azotobacter chroococcum</i>	5	13.32	14.73	15.12
	10	10.74	13.15	13.49
	15	10.98	12.77	12.77

Enzim merkuri reduktase mengkatalisis reaksi reduksi ion merkuri anorganik menjadi elemental merkuri yang volatil, FAD menggunakan NADPH sebagai donor elektron (Fox & Walsh, 1982). NADPH dan NADH memiliki fungsi yang tidak berbeda sebagai donor elektron dengan potensial reduksi pada NADPH sebesar -0,320 volt dan NADH sebesar -0,315 volt sehingga mempunyai kemolaran yang sama yaitu sebesar 0,000622 μM (Voet & Voet, 1990).

Nilai NADH yang teroksidasi semakin tinggi maka nilai HgCl₂ yang tereduksi juga akan semakin besar, begitu juga dengan Hg²⁺ tereduksi juga semakin besar, hal ini menunjukkan NADPH atau NADH sebagai donor elektron berperan dalam reaksi enzimatik dalam reduksi Hg²⁺ menjadi Hg⁰. Secara kimia reaksinya adalah



Hg²⁺ tereduksi membutuhkan koenzim NADPH atau NADH sebagai donor elektron untuk mereduksi Hg²⁺ menjadi Hg⁰ volatil. Secara rinci hasil reduksi Hg²⁺ dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6. Hg^{2+} tereduksi dan efisiensi reduksi Hg^{2+} .

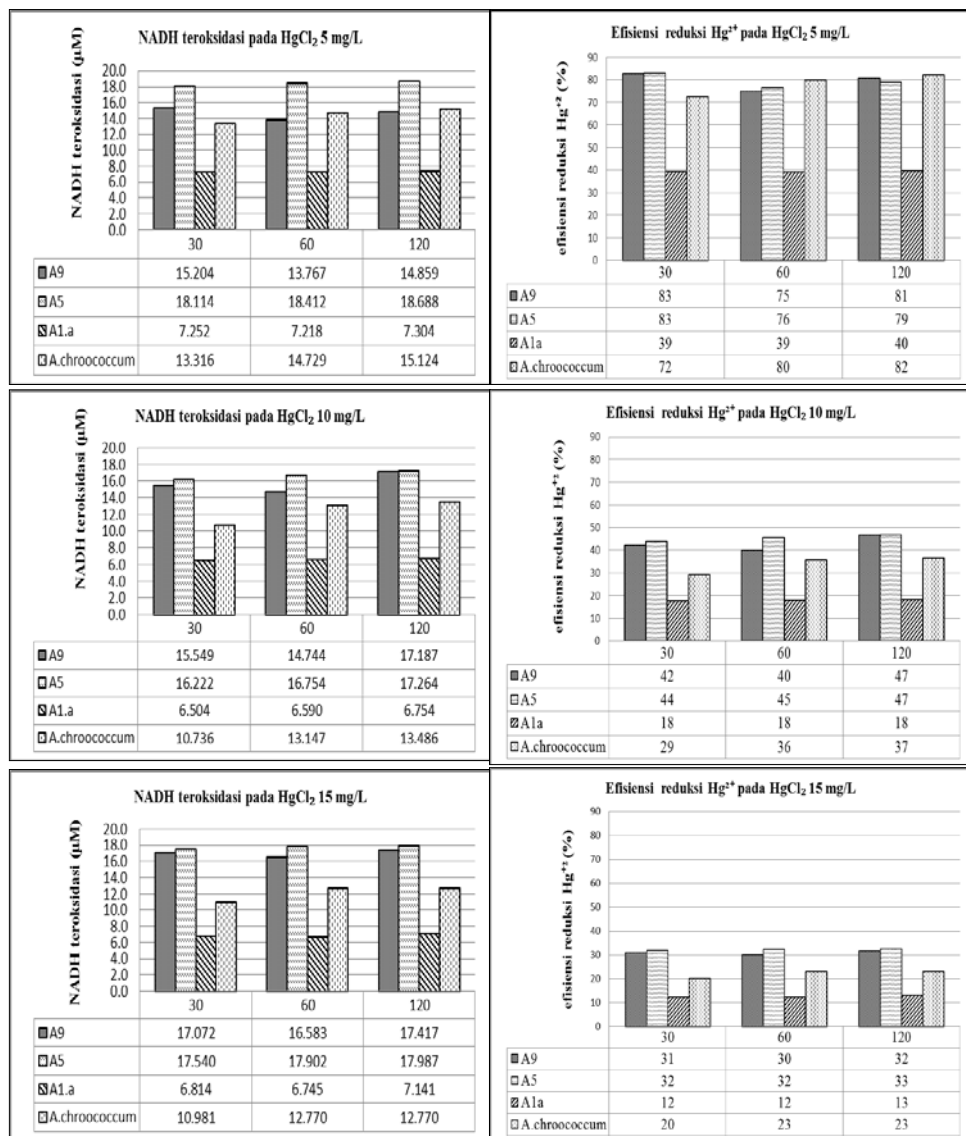
Kode Isolat	Konsentrasi HgCl_2 (mg/L)	Hg^{2+} tereduksi (mg/L)			Efisiensi reduksi Hg^{2+} (%)		
		30	60	120	30	60	120
A1a	5	1.45	1.45	1.47	39	39	40
	10	1.30	1.32	1.35	18	18	18
	15	1.37	1.35	1.43	12	12	13
A5	5	3.06	2.82	2.91	83	76	79
	10	3.25	3.36	3.46	44	45	47
	15	3.52	3.59	3.61	32	32	33
A9	5	3.05	2.76	2.98	83	75	81
	10	3.12	2.96	3.45	83	40	47
	15	3.42	2.96	3.49	31	30	32
<i>A. chroococcum</i>	5	2.67	2.95	3.03	72	80	82
	10	2.15	2.64	2.71	29	36	37
	15	2.20	2.56	2.56	20	23	23

Dari Tabel 4.6 isolat A1a mempunyai kemampuan reduksi Hg^{2+} relatif rendah < 2 mg/L sedangkan pada isolat *Azotobacter* A5 dan A9 relatif sama yaitu sebesar ± 3 mg/L dan pada *A. chroococcum* ± 2 mg/L. Hal ini sesuai dengan hasil uji resistensi HgCl_2 , bahwa A5 dan A9 lebih resisten dibandingkan A1a, sehingga A5 dan A9 kemampuan reduksi Hg^{2+} lebih besar dari A1a. Pada hasil resistensi A5 dan A9 resisten optimum pada 10 mg/L HgCl_2 dan mempunyai aktivitas enzim merkuri reduktase ± 3 mg/L, lebih tinggi dibandingkan isolat A1a dan kontrol *A. chroococcum* yang resisten optimum pada 5 mg/L HgCl_2 . Konsentrasi substrat berpengaruh terhadap reaksi enzim (Lehninger, 2004), substrat yang ditambahkan dalam penelitian ini adalah NADH sebesar 100 μM yang hanya diberikan satu kali. Pada konsentrasi substrat yang rendah maka reaksi enzim akan menjadi rendah, tetapi reaksi akan meningkat jika konsentrasi substrat meningkat. Enzim bergabung dengan molekul substrat membentuk kompleks enzim substrat dengan mekanisme *lock and key* atau *induced fit* (Lehninger, 2004).

Berdasarkan Tabel 4.6 secara umum efisiensi reduksi Hg^{2+} relatif tinggi pada konsentrasi 5 mg/L yaitu >70% kecuali pada isolat A1a yaitu <40%, isolat A1a mempunyai resistensi terhadap HgCl_2 yang rendah sehingga produksi enzim merkuri reduktase relatif rendah dibandingkan isolat yang mempunyai resistensi tinggi terhadap HgCl_2 . Isolat A5, A9 dan kontrol *A. chroococcum* mempunyai efisiensi reduksi Hg^{2+} >70% disemua inkubasi pada konsentrasi 5 mg/L HgCl_2 dan akan menurun efisiensinya ketika konsentrasi HgCl_2 menjadi 10 mg/L dan 15 mg/L yaitu 20-40% kecuali isolat A9 dikonsentrasi 10 mg/L HgCl_2 \pm 80% dengan waktu inkubasi 30 menit efisiensi reduksi Hg^{2+} dapat dilihat pada diagram batang yang ditampilkan pada Gambar 4.5.

Mekanisme reduksi secara enzimatik disebabkan adanya gen *mer* operon yaitu gen *merA* yang menyandi enzim merkuri reduktase (Brown *et al.*, 2003). Merkuri reduktase adalah enzim yang termasuk flavoprotein yaitu enzim oksidoreduktase untuk detoksifikasi merkuri anorganik (Hg^{2+}) menjadi merkuri volatil (Hg^0) (Fox & Walsh, 1982).

Berdasarkan diagram batang pada Gambar 4.5 persen efisiensi reduksi Hg^{2+} isolat *Azotobacter* A5 mempunyai efisiensi reduksi paling tinggi yaitu mencapai 83% pada konsentrasi HgCl_2 5 mg/L, 47% pada HgCl_2 10 mg/L, dan 33% pada konsentrasi HgCl_2 15 mg/L. Sedangkan isolat yang efisiensi reduksi paling rendah adalah isolat *Azotobacter* A1a yang mencapai 40% pada konsentrasi HgCl_2 5 mg/L, 18% pada HgCl_2 10 mg/L, dan 13% pada konsentrasi HgCl_2 15 mg/L. Semakin besar persen efisiensi reduksi Hg^{2+} maka isolat *Azotobacter* semakin baik dalam mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 dan berpotensi sebagai agen bioremediasi merkuri.

Gambar 4.5. NADH teroksidasi dan efisiensi reduksi Hg^{2+}

Ada empat faktor yang mendukung efisiensi kerja enzim yaitu letak dan orientasi substrat dalam hubungannya dengan gugus katalitik, tegangan dan berubahnya ikatan objek oleh dorongan penempatan enzim, katalisator umum asam basa, dan katalisator kovalen (Lehninger, 2004). Enzim merkuri reduktase berikatan dengan molekul NADPH yang akan mendonorkan 2 elektron untuk Hg^{2+} menjadi Hg^0 sehingga terjadi reduksi bilangan oksidasi. Secara invitro NADPH dapat diganti NADH sebab NADPH relatif tidak stabil jika digunakan untuk *bioassays* (Meissner & Falkinham II, 1983). Reaksi reduksi oksidasi pada mikroorganisme dimediasi oleh suatu molekul yang berfungsi sebagai koenzim yaitu $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ dalam bentuk teroksidasi (Madigan *et al.*, 2006) dan bentuk tereduksinya adalah NADH dan NADPH. Koenzim ini sebagai pembawa sementara ion H^+ yang dipindahkan secara enzimatik dari molekul koenzim (Lehninger, 2004).

“Halaman ini sengaja dikosongkan “

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian Aktivitas Enzim Merkuri Reduktase Pada *Azotobacter* Sebagai Enzim Pereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 adalah:

1. Hasil dari isolasi *Azotobacter* yang resisten HgCl_2 dari lahan *eco urban farming* ITS adalah 10 isolat yaitu A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, A10. Pada isolat A5, A6 dan A9 resisten sampai 20 mg/L HgCl_2 , isolat A7, A10 dan kontrol *A. chroococcum* resisten sampai 15 mg/L, isolat A1a resisten sampai 10 mg/L HgCl_2 , isolat A1b, A2, A3 dan A8 resisten sampai 10 mg/L HgCl_2 .
2. Aktivitas enzim merkuri reduktase pada isolat *Azotobacter* A5 dan A9 mereduksi Hg^{2+} lebih unggul dibandingkan A1a dan kontrol *A. chroococcum* dengan daya reduksi Hg^{2+} mencapai ± 3 mg/L
3. Isolat *Azotobacter* A5 dan A9 mempunyai daya efisiensi reduksi $\text{Hg}^{2+} > 70\%$ sedangkan pada Isolat *Azotobacter* A1a daya efisiensi reduksinya $< 40\%$ pada konsentrasi 5 mg/L HgCl_2 .

5.2 Saran

Beberapa saran untuk penelitian lanjutan antara lain:

1. Perlu dilakukan sekuensing gen 16S rRNA pada masing-masing isolat untuk mengetahui spesies tiap isolat *Azotobacter* yang didapatkan.
2. Modifikasi NADH sebagai donor elektron perlu diberikan dengan konsentrasi yang berbeda untuk reduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 .

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

Lampiran 1: Pengamatan makroskopis pada media *Azotobacter* agar dan *Nutrien Agar*

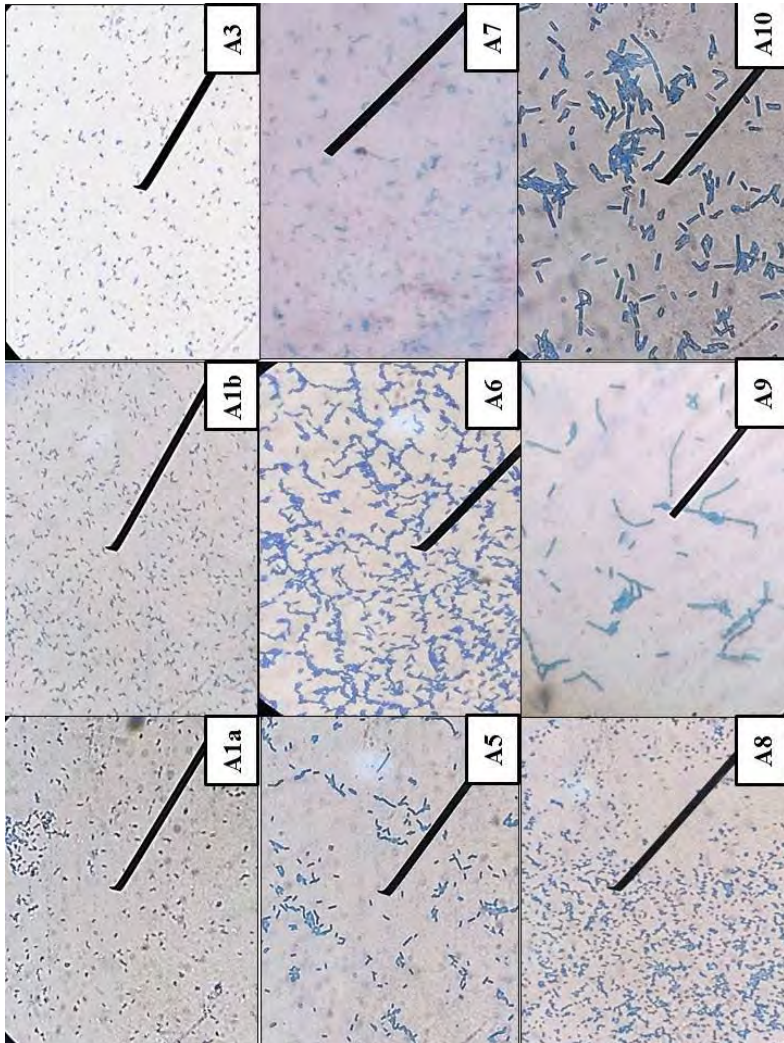
KARAKTERISASI KOLONI *Azotobacter* PADA MEDIUM NA (24 JAM)

Isolat	Form	Elevasi	Margin	Warna	Ukuran Koloni	Bentuk Sel	Pewarnaan Gram	Tekstur	OP	Appearance
A1a	circular	convex	entire	putih susu	1 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth (basah seperti beaur)	opaque	agak shiny
A1b	circular	convex	entire	putih susu	3 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth (basah seperti beaur)	opaque	agak shiny
A2	circular	flat	undulate	putih susu	3 mm	coccus	Gram (-)	kurang smooth	opaque	dull
A3	circular	convex	entire	putih susu	4 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth (basah seperti beaur)	opaque	agak shiny
A5	circular	convex	entire	krem	2 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth (basah seperti beaur)	opaque	agak shiny
A6	circular	convex	entire	krem	2 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth	opaque	dull
A7	circular	convex	entire	putih susu	2 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth	opaque	agak shiny
A8	circular	convex	entire	krem	1 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth (basah seperti beaur)	opaque	agak shiny
A9	irregular	flat	entire	krem	4 mm	basil pendek	Gram (-)	kurang smooth	opaque	dull
A10	irregular	flat	entire	krem	3 mm	basil pendek	Gram (-)	kurang smooth	opaque	dull

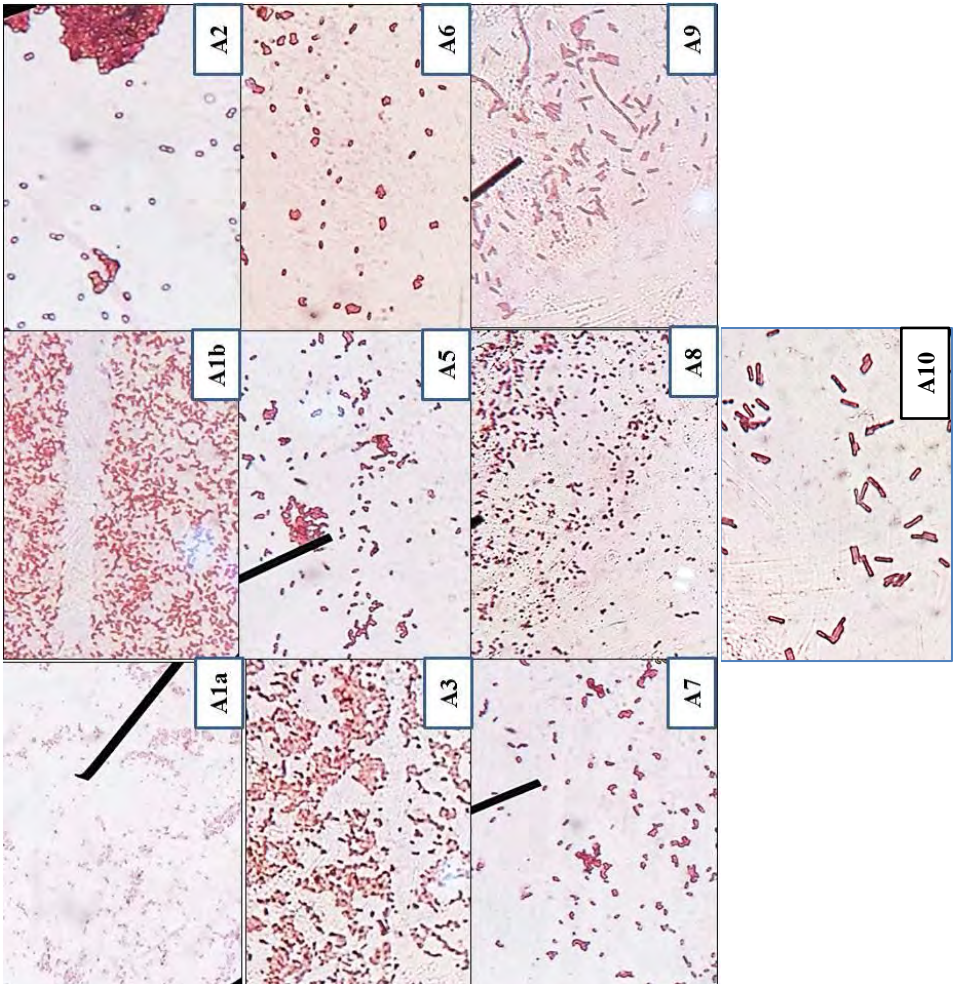
KARAKTERISASI KOLONI *Azotobacter* PADA MEDIUM *Azotobacter* Mannitol Agar + Mo + BTB 48 JAM

Isolat	Form	Elevasi	Margin	Warna koloni muda	Ukuran Koloni	Bentuk Sel	Pewarnaan Gram	Tekstur	OP	Appearance	warna koloni tua (> 1 bulan)	tekstur koloni tua (> 1 bulan)	appearance koloni tua (> 1 bulan)
A1a	irregular	flat	undulate	krem	10 mm	basil pendek	Gram (-)	agak rough (basah seperti beaur)	opaque	dull	coklat	smooth (basah seperti beaur)	agak shiny
A1b	circular	convex	entire	krem bening	20 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth (basah seperti beaur)	opaque	agak shiny	krem kecoklatan	Smooth (basah seperti beaur)	agak shiny
A2	circular	convex	entire	krem kecoklatan	2 mm	coccus	Gram (-)	smooth	opaque	agak shiny	coklat	smooth	agak shiny
A3	circular	pukinate	entire	krem bening	3 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth (basah seperti beaur)	opaque	agak shiny	kuning de pusat koloni orange	smooth (basah seperti beaur)	agak shiny
A5	circular	convex	undulate	putih susu	3 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth	opaque	dull	krem agak coklat	smooth	dull
A6	circular	convex	erose	putih susu	3 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth	opaque	dull	krem agak coklat	smooth	dull
A7	circular	convex	erose	putih susu	2 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth	opaque	dull	krem	smooth	dull
A8	circular	flat	entire	transparan	2 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth	transparan	shiny	transparan	smooth	shiny
A9	irregular	flat	undulate	putih susu	3 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth	opaque	dull	krem kekuningan	smooth	dull
A10	irregular	raised	erose	putih susu	5 mm	basil pendek	Gram (-)	smooth (basah seperti beaur)	translucent	agak shiny	krem	Smooth (basah seperti beaur)	agak shiny

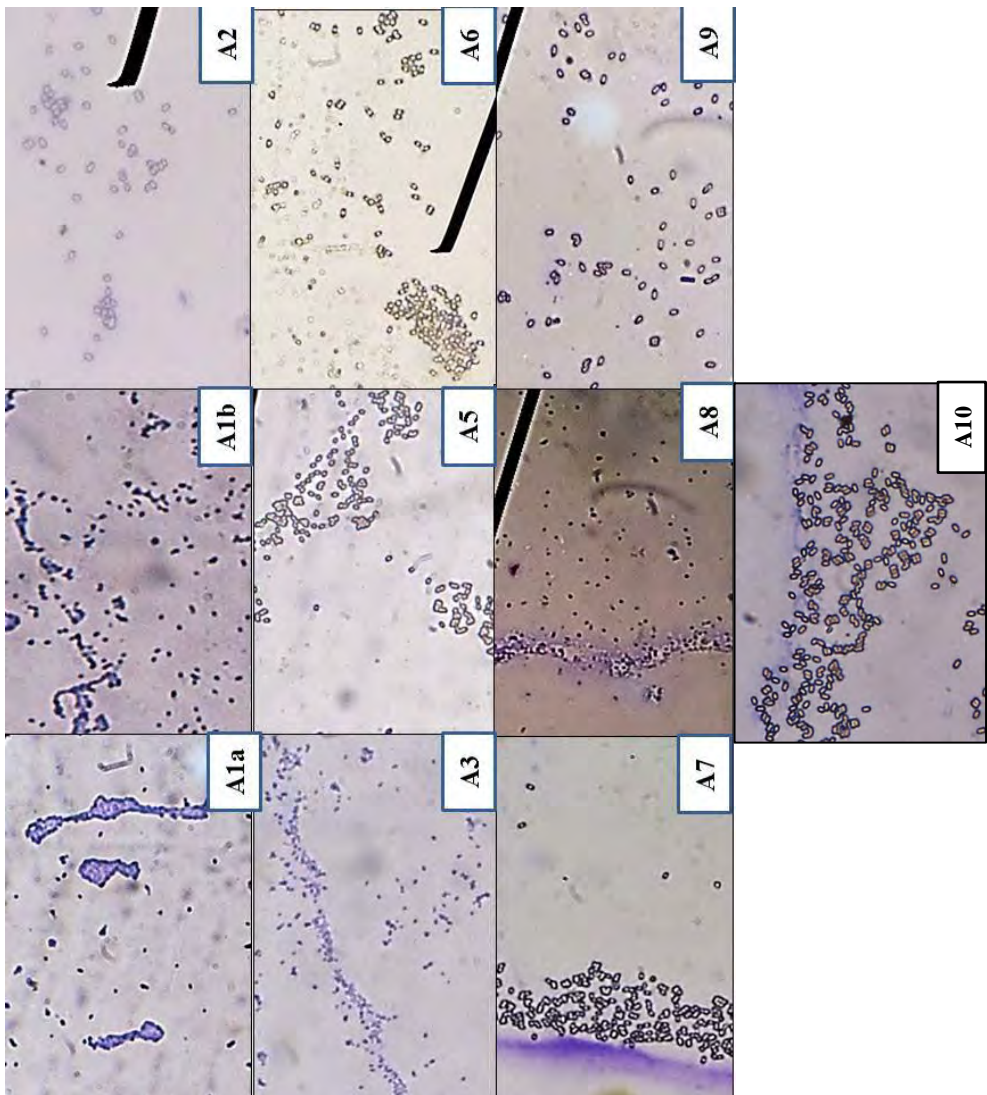
Lampiran 2: Pengamatan mikroskopis dengan pewarnaan
methylen blue



Lampiran 3: Pengamatan mikroskopis dengan pewarnaan Gram



Lampiran 4: Pengamatan kista dengan pewarnaan Geimsa



Lampiran 5: Pengamatan uji resistensi HgCl_2

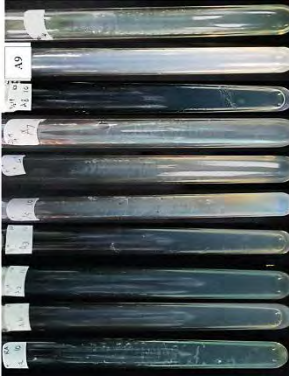
Media agar *Azotobacter*– HgCl_2 0,5 mg/L



Media agar *Azotobacter*– HgCl_2 5 mg/L.



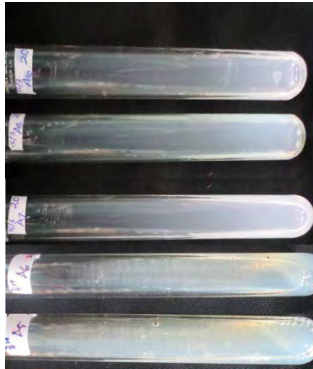
Media agar *Azotobacter* – HgCl_2 10 mg/L



Media agar *Azotobacter* – HgCl_2 15 mg/L



Media agar *Azotobacter* – HgCl_2 20 mg/L



“Halaman ini sengaja dikosongkan”

Lampiran 7: Pembuatan Larutan stok MRA (*mercury reductatase assays*).

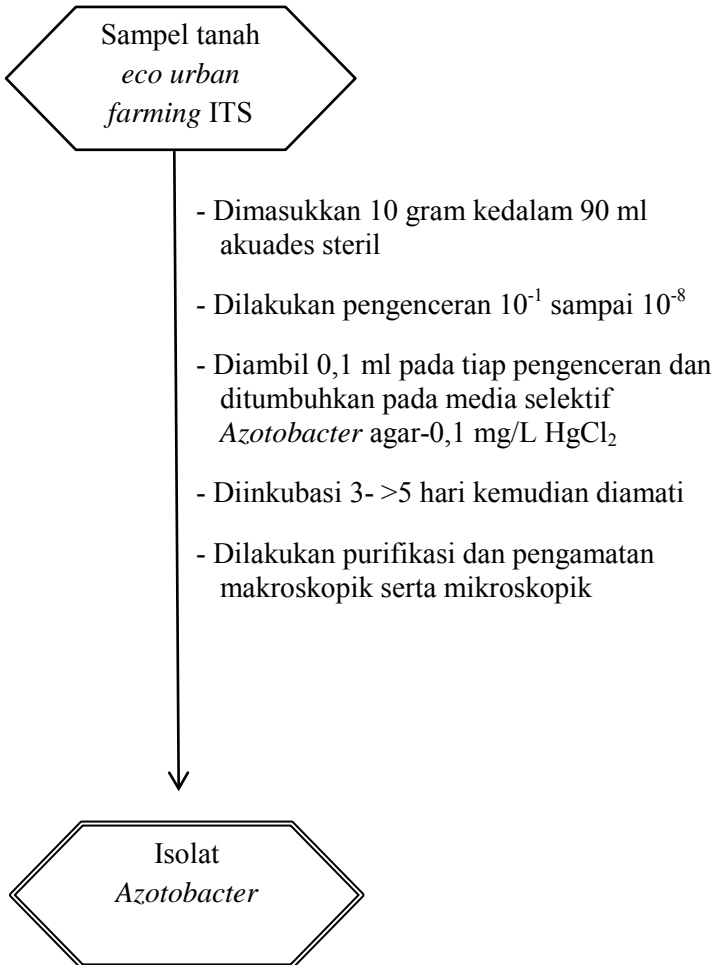
Dalam larutan 200 mL.

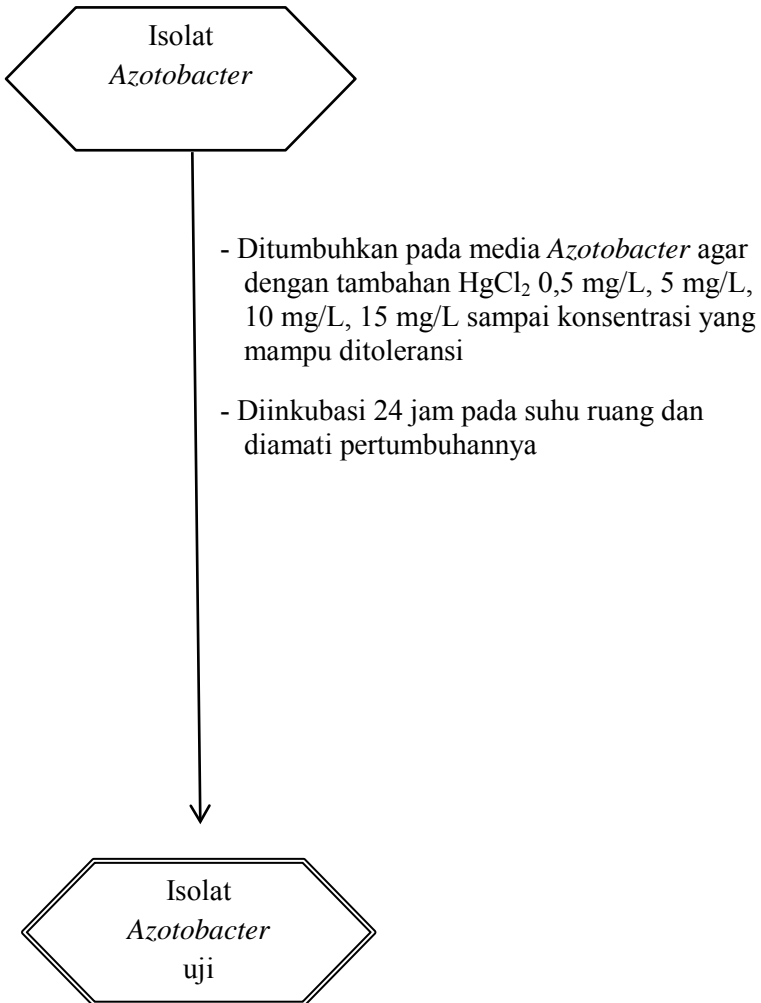
- PBS 50 mM disediakan sebanyak 200 ml
- EDTA 0,5 mM dibuat dengan menimbang 292,2 mg NA-EDTA kemudian dilarutkan.
- MgSO_4 200 μM dibuat dengan menimbang 4,8 mg kemudian dilarutkan.
- 0,1% 2-merchптоetanol dibuat dengan mengukur 0,2 ml kemudian dilarutkan.
- 100 μM NADH dibuat dengan menimbang 14,2 m g kemudian dilarutkan.

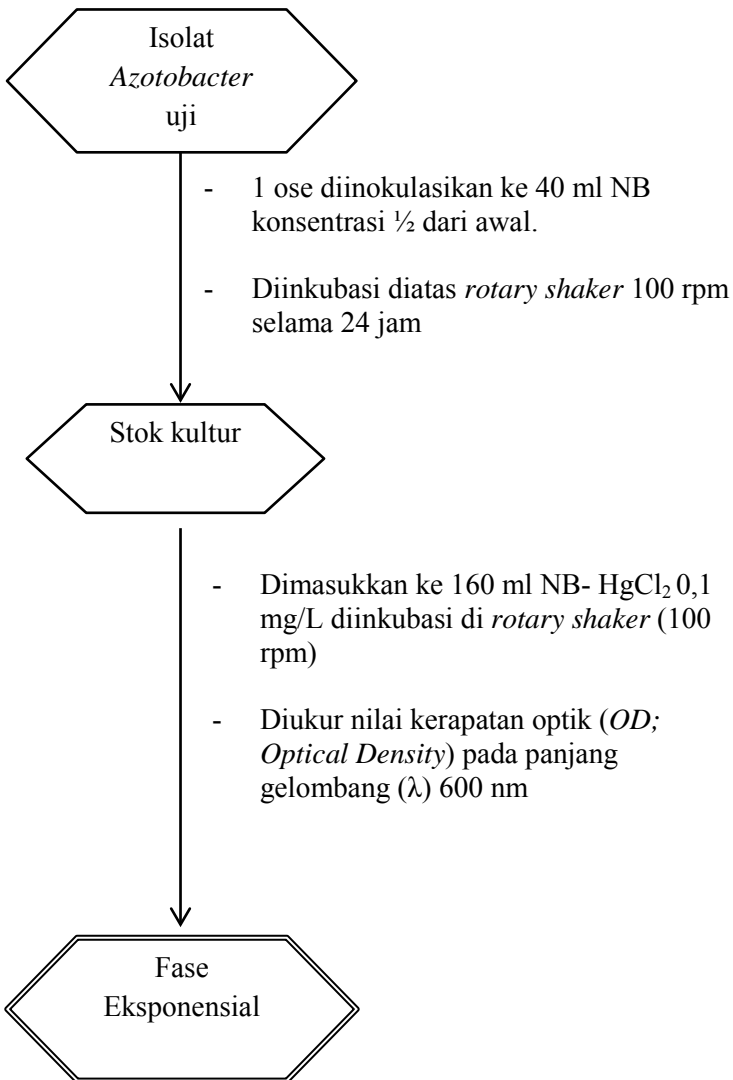
Pembuatan Larutan stok HgCl_2 1000 mg/L

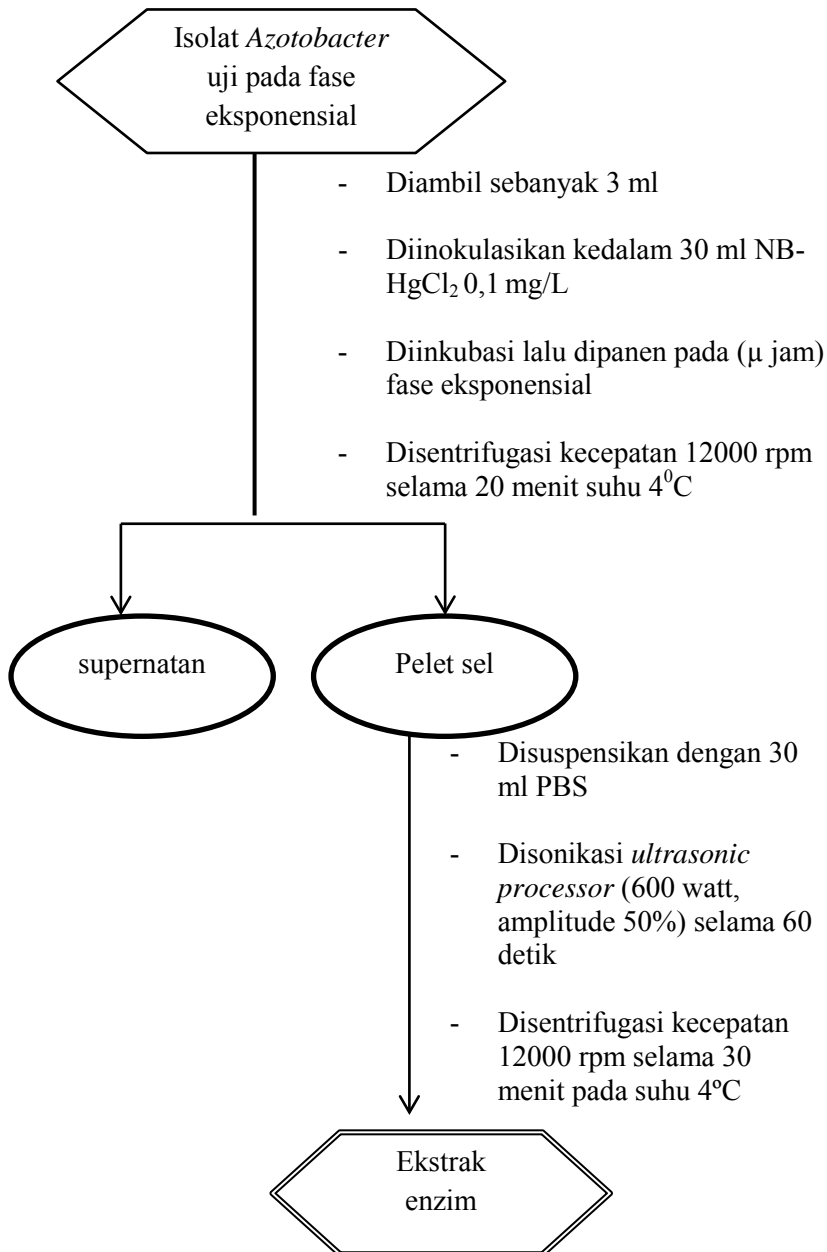
- HgCl_2 1000 mg dilarutkan dalam 1L/ 1000 ml akuades steril.

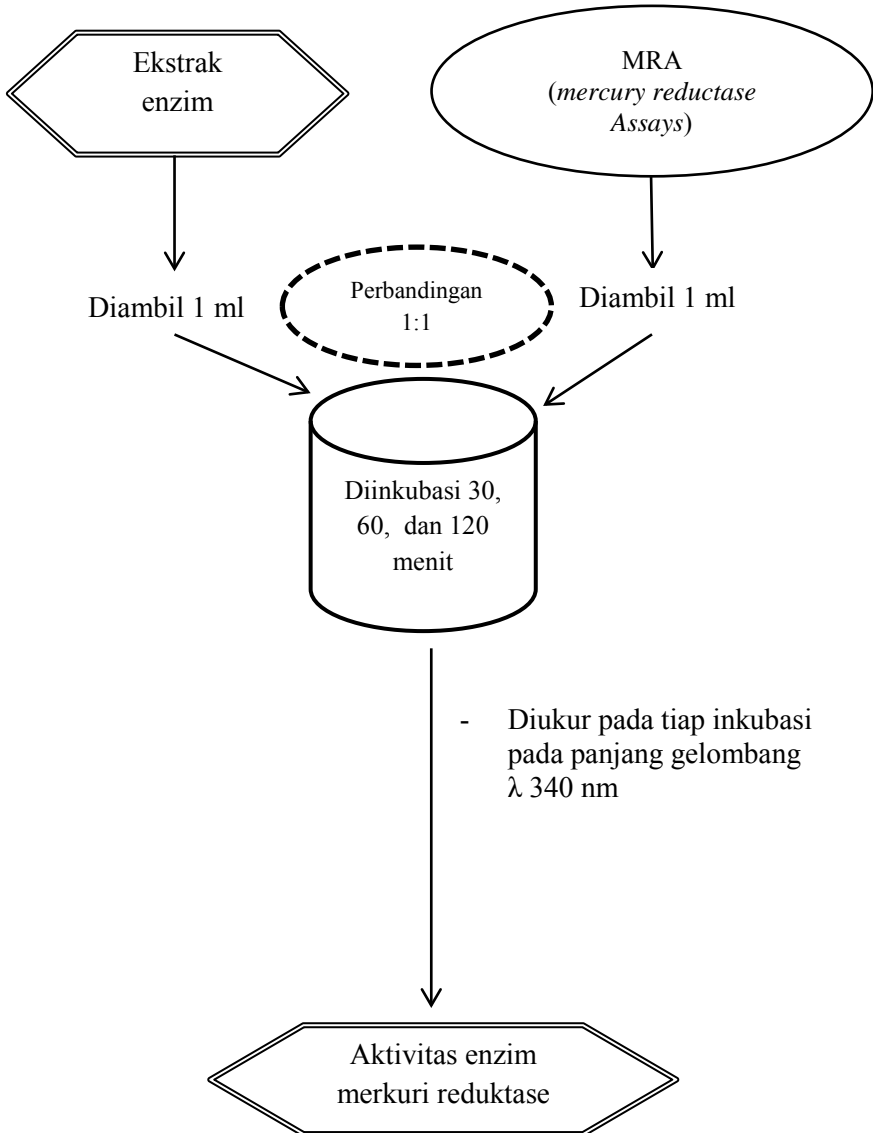
Lampiran 8: Skema kerja dalam penelitian
Isolasi *Azotobacter*



Uji resistensi HgCl_2 

Kurva pertumbuhan *Azotobacter*

Persiapan ekstrak enzim

Uji aktivitas enzim merkuri reduktase

Lampiran 6: Hasil perhitungan NADH teroksidasi dan aktivitas enzim merkuri reduktase

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di kota Wonosobo, Jawa Tengah pada tanggal 15 Juni 1991 sebagai anak ke-4 dari 4 bersaudara dari pasangan Muhammad Mahmud Syihab dan Suprpti Mutmainah. Pendidikan formal ditempuh di TK Islam Wonosobo, SD Islam Miftahul-Huda Wonosobo, SMP Takhassus Al-Qur'an Wonosobo, SMA Takhassus Al-Qur'an Wonosobo. Penulis melanjutkan studi Strata-1 di Jurusan Biologi ITS Surabaya pada tahun 2010 dan terdaftar dengan NRP.1510100046 melalui jalur SNMPTN. Selama kuliah penulis pernah mengikuti beberapa pelatihan, diantaranya Pelatihan Karya Tulis Ilmiah (PKTI), Emotional Spiritual Quation (ESQ), LKMM Pra-TD serta pernah menjadi Bendahara Umum-1 Himpunan Mahasiswa Biologi ITS periode 2012/2013.